

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.



(19) RU (11) 2077725 (13) C1

(51) 6 G 01 N 33/53

Комитет Российской Федерации  
по патентам и товарным знакам

23 JUN 1997

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**  
к патенту Российской Федерации

ВСЕРОССИЙСКАЯ  
ПАТЕНТНО-ТЕХНИЧЕСКАЯ  
БИБЛИОТЕКА

1

(21) 5030789/14

(22) 05.03.92

(46) 20.04.97 Бюл. № 11

(75) Муратходжаев Нариман Кадырович(UZ), Рашидова Римма Адыловна(UZ), Прус Евгений Сергеевич(UZ), Даминава Эльнура Алимджановна(UZ), Сольская Любовь Львовна(UZ)

(73) Сольская Любовь Львовна (UZ), Даминава Эльнура Алимджановна (UZ)

(56) Г.А.Ткачева и др. Радиоиммунологические методы исследования./ Справочник. - М.: Медицина, 1983.

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНОГО АНТИГЕНА ПРИ

2

ПОМОЩИ СПЕЦИАЛЬНОГО АНТИТЕЛЬНОГО ДИАГНОСТИКУМА

(57) Использование: в области медицины, в частности в иммунологии. Сущность изобретения: смешивают пробы сыворотки крови обследуемого с диагностикумом, полученным из специфических антител к РЭА, связанных с эритроцитами крови 1 - 2-х летних кур, эритроциты которых обработаны глутаральдегидом, с последующей регистрацией агрегатгеммагглютинации антигена с антителом. Способ позволяет упростить обнаружение РАЭ и использовать его в широкой повседневной медицинской практике. 4 табл.

PTO 2002-5060

S.T.I.C. Translations Branch

RU

2077725

C1

RU

2077725

C1

Изобретение относится к медицине, к способам диагностики, а именно, к иммунологическому анализу с помощью лекарственных препаратов, содержащих носители, связанные с антителами, и может быть использовано для выявления лиц с наличием опухолей - продуцентов раково-эмбрионального антигена (РЭА). Опухолевой антиген РЭА - является гликопротеином с  $M.B.=200000$  дальтон. В крови здоровых людей может обнаруживаться по нашим и литературным (1) данным в концентрациях от 0 до 20 нг/мл (при определении методом радиоиммунного анализа), а увеличение его концентрации свыше 40 нг/мл свидетельствует о наличии злокачественного опухолевого процесса в организме.

Известен способ радиоиммунологического анализа (РИА), для определения концентрации РЭА у человека. Способ включает смешивание сыворотки крови человека со специфическими антителами, меченными радиоактивными изотопами, с последующей инкубацией, разделением, радиометрией и регистрацией результатов (2).

Способ позволяет определить уровень РЭА от 0 до 360 и более нг/мл в сыворотке крови обследуемых.

Однако широкое использованием этого метода, в том числе и в процессе всеобщей диспансеризации, практически не осуществимо из-за отсутствия в стране достаточно развитой сети радиоиммунологических диагностических лабораторий; ограниченного количества и дороговизны выпускаемых в стране и приобретаемых за рубежом радиоиммунных наборов и относительно высокой стоимости аппаратуры для этих исследований; опасности для здоровья, которую представляет сама процедура мечения белка радионуклидом, подготовка и выполнение радиоиммунологических анализов; необходимости наличия специальных помещений, оборудования, средств защиты персонала, способов транспортировки и захоронения радиоактивных отходов.

Совокупность всех перечисленных факторов побуждает к поиску других носителей антител для приготовления антительного диагностикума, используемого в реакции АГА.

Авторами проведена работа по исследованию других носителей (эритроцитов кроликов, барана, птиц - кур и голубей), обладающих способностью адсорбировать на своей поверхности антитела. Из перечисленных видов эритроцитов, наиболее соответствующими задачам анализа оказались

эритроциты кур. Использование эритроцитов кур позволяет добиться удешевления и упрощения способа обнаружения РЭА за счет использования общедоступного сырья для приготовления эритроцитарного антительного диагностикума.

Поставленная задача решается тем, что в способе выявления РЭА у человека производится смешивание пробы сыворотки крови обследуемого со специфическими антителами, связанными с эритроцитами и последующей регистрацией результатом взаимодействия антигена - антитела в реакции АГА. Антительный эритроцитарный диагностикум получают путем обработки глутаральдегидом эритроцитов крови 1 - 2-х летних кур и присоединения к ним анти-РЭА-антител.

Суть изобретения заключается в том, что исследованы и выбраны эритроциты кур, обладающие высокой адсорбционной активностью и минимальной способностью к перекрестным реакциям с тканями человека.

Забор куриной крови, являющейся одним из отходов производства птицефабрик, не требует стерильного оборудования и других вышеперечисленных факторов, упомянутых при заборе крови у людей. Технология забора крови у кур приводит к значительному удешевлению одного из основных компонентов (эритроцитов) реакции АГА.

Все остальные этапы подготовки реагентов для постановки реакции АГА не имеют существенного отличия от прототипа.

Таким образом, использование куриных эритроцитов вместо человеческих устраняет риск инфицирования доноров и мед. персонала инфекционными агентами, упрощает технологический процесс приготовления реактивов и удешевляет стоимость реакции.

Эритроциты кур получают путем обезглавливания животных с последующим забором крови в среду Ольсевера, в соотношении 1:2. Кровь фильтруют, получают из нее эритроциты, которые 10-тикратно отмывают физиологическим раствором с центрифугированием при 4000 об/мин. К полученному осадку эритроцитов добавляют двухкратный объем физиологического раствора с  $pH=7,2$ , содержащий 0,25% раствор глутаральдегида, взвесь перемешивают, инкубируют 3 часа при температуре  $37^{\circ}C$ . После инкубации эритроциты отмывают 4 раза физиологическим раствором в соотношении 1:10, затем добавляют к осадку эритроцитов физиологический раствор до получения 8%-ной суспензии. Для консервации добавляют

мертиолат натрия до получения конечной концентрации его 1:10000.

Для получения диагностикума на 40 определений берут 1 мл антител к РЭА рН=7,2 - 7,4, добавляют 0,03 - 0,04 мл 2,5% водного раствора глутаральдегида и инкубируют 1 час при температуре 37° С.

К 1 мл 8% суспензии эритроцитов добавляют 1 мл глутаризированных антител к РЭА и 20 мг бикарбоната натрия, инкубируют 2 часа при температуре 56° С и затем еще 0,5 часа при комнатной температуре при постоянном встряхивании. Отмывают эритроциты от несвязавшихся антител 4-х кратным центрифугированием при 3000 об/мин по 4 мин. Из осадка готовят 8% взвесь в физиологическом растворе, которая и является специфическим эритроцитарным антигеным диагностикумом.

Пример осуществления способа.

Реакция осуществляется в У-образных полистироловых планшета. В каждую лунку планшета вносят по 0,025 мл физиологического раствора и готовят разведения исследуемой неактивированной сыворотки крови больного, начиная с 1:2.

Во все лунки добавляют по 0,025 мл эритроцитарного диагностикума. Последняя 8-я лунка в каждом ряду служит для контроля диагностикума, т.к. в ней отсутствует антиген, содержащийся в исследуемой сыворотке. После осторожного встряхивания планшет помещают в термостат при температуре 37° С. Результат реакции оценивают через 1,5 - 2 часа и проводят учет реакций по образованию "кольца" по 4-х бальной системе.

Сравнительные испытания антигенов эритроцитарных диагностикумов в реакции АГА с разными концентрациями стандарта РЭА в физиологическом растворе показали, что антигеновый диагностикум анти-РЭА из эритроцитов кур позволяет выявить в реакции агрегаттмагглютинации в сыворотке крови человека специфический антиген до 8 нг/мл, что по чувствительности не уступает реакции агрегаттмагглютинации с диагностикумом из человеческих эритроцитов (таблица 1).

Как видно из приведенных в таблице 1 данных, во всех случаях чувствительность реакции АГА, выполненных с использованием эритроцитов кур и человека, не различаются.

Данные, приведенные в таблице 2, показывают, что: 1) - титр реакции АГА зависит от концентрации РЭА в сыворотке крови, чем больше концентрация РЭА, тем больше титр положительных реакций; 2) -

антигеновый диагностикум анти-РЭА из эритроцитов кур равен по активности таковому из эритроцитов человека.

Таким образом, определение чувствительности антигеновых диагностикумов анти-РЭА показали, что эритроцитарный антигеновый диагностикум (ЭАД) из эритроцитов кур по чувствительности не уступает диагностикуму из эритроцитов человека и позволяет обнаружить РЭА в реакции АГА в концентрациях равных 8 и более нг/мл.

С целью экономии сырья (эритроцитов кур) экспериментально были подобраны минимальные концентрации эритроцитов в ЭАД, обеспечивающие получение четких результатов реакции АГА.

Из готового ЭАД, содержащего 8% взвесь эритроцитов, готовили несколько разведений (6%, 5%, 4%, 3%, 2%) и ставили реакцию АГА со стандартом РЭА (477 нг/мл). Полученные данные приведены в таблице 3.

Как видно из результатов, представленных в таблице 3, наибольшее количество положительных результатов при максимальных разведениях РЭА (1:64 - 1:128), что соответствуют 7,5 - 3,8 нг/мл, зарегистрировано при использовании 4% ЭАД. В дальнейшем мы использовали для постановки реакции АГА ЭАД, содержащий 4% эритроцитов кур.

Для определения информативности реакции АГА с ЭАД из эритроцитов кур проведено исследование 25 стандартных образцов РЭА, сывороток крови 30 доноров, 30 больных с онкологическими заболеваниями и 186 больных с острыми и хроническими воспалительными заболеваниями (таблица 4).

У здоровых людей титр реакции АГА не превышал 1:4. Почти аналогичные результаты получены при обследовании больных с неонкологическими заболеваниями: у 183 из 186 человек (98,9%) из этой группы положительные реакции отмечались в титре 1:2 - 1:4, и только у 3 (1,1%) - в титре 1:8. У больных с онкологическими заболеваниями титр реакции АГА в подавляющем большинстве случаев (86,6%) 1:8 - 1:64.

Таким образом, при помощи реакции АГА с ЭАД из эритроцитов кур можно выявить лиц с высоким титром реакции (т.е. высокими концентрациями РЭА) в сыворотке крови, что указывает на возможное наличие у них онкологических заболеваний и необходимость дальнейшего наблюдения у специалистов-онкологов.

На основании изложенного представляется возможным считать, что авторами предложен новый способ обнаружения РЭА в

сыворотке крови обследуемых, свидетельствующего о возможном наличии у них злокачественного новообразования. Но в и з н а предлагаемого способа заключается в том, что впервые для обнаружения РЭА использованы глютаризированные эритроциты кур, на поверхности которых адсорбированы антитела к РЭА.

Изобретательский уровень разработанного способа заключается в том, что для обнаружения РЭА использованы не применявшиеся ранее иммунологические подходы,

реализованные в присоединении специфических антител против РЭА к не использованному ранее носителю - эритроцитам кур.

Простота выполнения способа, доступность сырья (эритроцитов кур), безопасность лабораторных манипуляций и дешевизна применяемых реагентов позволяют использовать способ обнаружения РЭА при помощи антительного диагностикума из эритроцитов кур в широкой повседневной медицинской практике.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ обнаружения раковоэмбрионального антигена (РЭА) при помощи специального антительного диагностикума путем смешивания пробы сыворотки крови с диагностикумом, полученным из специфических антител к РЭА, связанных с эритроцитами, обработанными глютаральдегидом с последующей регистрацией реакции агрегат-

геммагглютинации антигена с антителом, *отличающийся* тем, что в качестве диагностикума используют специфические антитела к РЭА, связанные с эритроцитами крови одно-, двухлетних кур, обработанных глютаральдегидом.

Таблица 1

Сравнительное определение порога чувствительности реакции АГА с антительными диагностикумами из эритроцитов кур и человека

№№ пп	Антитель- ный диаг- ностикум из эритро- цитов	Кол- во опы- тов	Количество положительных реакций								
			разведение РЭА	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Конт.
			концентрация РЭА (нг/мл)	238	119	59	29	15	7,5	3,8	0
1	человека	10		10	10	10	10	10	9	8	0
2	кур	10		10	10	10	10	10	9	8	0

Таблица 2

Сравнительные результаты определения наличия РЭА при помощи двух типов антительных диагностикумов

№№ пп	Исследуемый материал	Антительный диагностикум из эритроци- тов	Кол-во опытов	Количество положительных проб с титром реакции					
				1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
1	Сыворотка крови здоро- вых доноров (РЭА в РИА до 20 нг/мл)	человека	24	14	10				
		кур	42	28	14				
2	Сыворотка крови онколо- гических больных (РЭА в РИА от 0 до 40 нг/мл)	человека	10			2	8		
		кур	13			3	10		
3	Сыворотка крови онколо- гических больных (РЭА в РИА 40 нг/мл)	человека	10			2	2	3	3
		кур	11			3	1	4	3

Т а б л и ц а 3

Результаты реакции АГА со стандартом РЭА (477 нг/мл) при различных концентрациях эритроцитов кур в ЭАД

№ пп	Концентрация эритроцитов в ЭАД	Кол-во опытов	Количество положительных реакций АГА								Контроль
			разведение РЭА	2:1	4:1	8:1	16:1	32:1	64:1	128	
			концентрация РЭА (нг/мл)	238	119	59	29	15	7,5	3,8	
1	8	4	4	4	4	4	4	4	3	3	-
2	6	4	4	4	4	4	4	4	3	3	-
3	5	4	4	4	4	4	4	4	3	3	-
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-
5	3	4	4	4	4	4	4	4	3	-	-
6	2	4	4	4	4	4	4	3	-	-	-

Таблица 4

Результаты реакции АГА с сыворотками крови больных и здоровых лиц с ЭАД из эритроцитов кур

№ пп	Обследуемые	Кол-во опытов	Количество положительных результатов в разведении сывороток крови:							
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Контроль
1	Онкологические больные	30	1	3	11	10	3	2	-	-
2	Больные с воспалительными заболеваниями	186	175	8	3	-	-	-	-	-
3	Здоровые лица	30	23	7	-	-	-	-	-	-
4	Стандарт РЗА 15 нг/мл	5	5	-	-	-	-	-	-	-
5	Стандарт РЗА 45 нг/мл	8	2	6	-	-	-	-	-	-
6	Стандарт РЗА 477 нг/мл	12	-	-	-	-	-	3	9	-

Заказ

*ЛН*

Подписное

ВНИИПИ, Рег. ЛР № 040720

113834, ГСП, Москва, Раушская наб., 4/5

121873, Москва, Бережковская наб., 24 стр. 2.

Производственное предприятие «Патент»